

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

F I

C 1 2 P 17/04

C 1 2 P 17/04

C 0 7 D 317/30

C 0 7 D 317/30

// (C 1 2 P 17/04

C 1 2 R 1:06)

C 0 7 M 7:00

審査請求 未請求 請求項の数 1 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号

特願平10-16842

(22) 出願日

平成10年(1998) 1月29日

(71) 出願人 390037327

第一化学薬品株式会社

東京都中央区日本橋3丁目13番5号

(72) 発明者 滝本 幸也

岩手県岩手郡松尾村松尾4-115 第一化学薬品株式会社岩手工場生産技術センター内

(72) 発明者 市東 利明

岩手県岩手郡松尾村松尾4-115 第一化学薬品株式会社岩手工場生産技術センター内

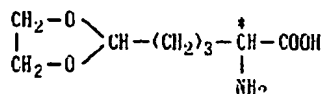
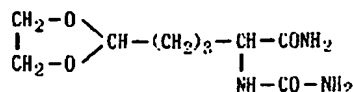
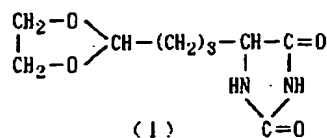
(74) 代理人 弁理士 有賀 三幸 (外4名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 光学活性 α -アミノアジピン酸- γ -セミアルデヒドエチレンアセタールの製造方法

(57) 【要約】

【解決手段】 下記式(1)及び/又は(2)で表わされる化合物にアルスロバクター属に属する微生物の菌体又は菌体処理物を作用せしめることを特徴とする下記式

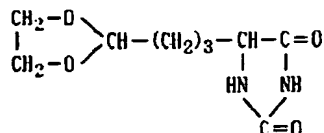


【効果】 医薬等の製造中間体として有用な化合物

(1) を工業的に有利に製造することができる。

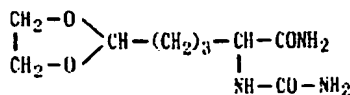
【特許請求の範囲】

【請求項1】 次の式(1)及び/又は(2)



(1)

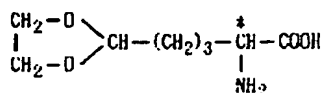
【化1】



(2)

で表わされる化合物にアルスロバクター属に属する微生物の菌体又は菌体処理物を作用せしめることを特徴とする次の式(3)

【化2】



(3)

で表わされる光学活性化合物又はその塩の製造方法。

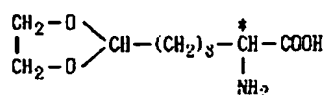
【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、薬品及び化粧品等の製造中間体として有用な次の式(3)

【0002】

【化3】



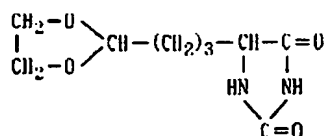
(3)

【0003】で表わされる光学活性化合物の製造方法に関する。

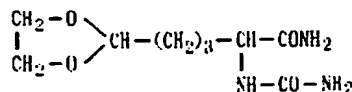
【0004】

【従来の技術】上記式(3)で表わされる化合物は、不斉炭素を有し、アミノ基、カルボキシル基、及びアセチル基の官能基を有し、ACEインヒビターを始めとする医薬品、化粧品(USP, 5508272)の製造中間体等として広範な活用が期待される化合物であり、産業上有用であると考えられる。

【0005】化合物(3)のラセミ体の製造法として

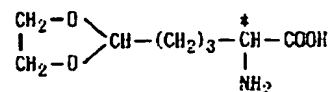


(1)



(2)

【化4】



(3)

【0011】で表わされる化合物にアルスロバクター属に属する微生物の菌体又は菌体処理物を作用せしめることを特徴とする次の式(3)

【0012】

【化5】

は、すでにEsmahanらの報告(Bioorganic & Medicinal Chemistry, 3, 1237(1995))がある。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、この方法は製造工程が長く、反応操作が煩雑であり、総収率は低く、製造原価も高く、然も有害なアセチル水銀を使用するなど工業的製造に適した製造方法とはいえない方法である。更にこの方法で得られる化合物はラセミ体であり光学活性体ではない。また、従来の酵素法による光学活性化合物(3)の製造方法において、無駄なく化合物(3)を得るには、目的とする絶対配置を有する光学活性体(例えばS-体)を得た後の反応系に残存する対掌体(例えばR-体)を単離し、ラセミ化し、再びこれから光学活性体を製造するなどの煩雑な工程が必要であった。

【0007】従って本発明の目的は、光学活性を有する化合物(3)を工業的に有利に製造する方法を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】斯かる実状に鑑み本発明者は鋭意研究を行った結果、下記式(1)及び式(2)で表わされる化合物に、アルスロバクター属に属する微生物の菌体又は菌体処理物を作用せしめることにより、下記式(3)で表わされる光学活性化合物又はその塩を工業的に有利に製造し得ることを見出し本発明を完成した。

【0009】すなわち本発明は、次の式(1)及び/又は(2)

【0010】

【0013】で表わされる光学活性化合物又はその塩の製造方法を提供するものである。

【0014】

【発明の実施の形態】本発明において、光学活性化合物(3)は、化合物(1)及び/又は(2)にアルスロバクター属に属する微生物の菌体又は菌体処理物を作用せしめることで得ることができる。ここで用いる原料たる化合物(1)及び(2)は、グルタルアルデヒドモノエチレンアセタールに水系溶媒中で、シアン化水素又はその塩、アンモニア又はその塩、及び炭酸ガス、炭酸水素塩類、炭酸塩類又はカルバミン酸塩類を反応させることにより得られる。

【0015】以下、上記工程を詳細に説明する。グルタルアルデヒドモノエチレンアセタール(以下、「モノアセタール体」という)は、公知の手段、例えば、グルタルアルデヒドとエチレングリコールとを反応させることにより得られる。このモノアセタール体を水系溶媒中で、シアン化水素又はその塩、アンモニア又はその塩、及び炭酸ガス又は炭酸塩類、炭酸水素塩類もしくはカルバミン酸塩類と反応させ、式(1)で表わされる化合物を得る。この際、主生成物である化合物(1)の他に、式(2)で表わされる化合物も副生する。

【0016】ここで用いる水系溶媒としては、水又は含水アルコールが好ましい。また、シアン化水素の塩としては、シアン化ナトリウム、シアン化カリウム等のシアン化アルカリが挙げられる。シアン化水素又はその塩は、モノアセタール体に対し、1~10倍当量使用することが好ましく、更に1~2倍当量使用することが好ましい。アンモニウム塩としては、例えば塩化アンモニウム、炭酸アンモニウム、炭酸水素アンモニウム、カルバミン酸アンモニウム等が挙げられる。アンモニア又はアンモニウム塩は、モノアセタール体に対して2~10倍当量程度使用することが好ましく、特に2~4倍当量程度使用することが好ましい。

【0017】炭酸水素塩類としては、例えば炭酸水素ナトリウム、炭酸水素カリウム等の炭酸水素アルカリ、炭酸水素アルカリ土類金属塩等が挙げられ、炭酸塩類としては炭酸ナトリウム、炭酸カリウム等の炭酸アルカリ、炭酸アルカリ土類金属塩等が挙げられ、カルバミン酸塩類としてはカルバミン酸ナトリウム、カルバミン酸カリウムなどが挙げられる。これらは、モノアセタール体に対して1~10倍当量使用することが好ましく、特に1~2倍当量使用することが好ましい。

【0018】また炭酸水素アンモニウム、又は炭酸アンモニウム、カルバミン酸アンモニウム等を用い、これらの化合物にアンモニウム塩と炭酸塩等との両者の作用をさせることもできる。これらの化合物の使用量は、モノアセタール体に対して1~10倍当量使用することが好ましく、特に2~4倍当量使用することが好ましい。

【0019】本工程の反応は、モノアセタール体に上記

の3種(又は2種)の化合物を同時に反応させてもよく、或いはモノアセタール体に先ずシアン化物を反応させ次いで他の2成分を同時に反応させてもよく、或いは又先ずシアン化物を反応させ次いでアンモニウム化合物を反応させ更に炭酸化合物を反応させてもよい。特に望ましい方法は、モノアセタール体をメタノール又はエタノールなどに溶解した溶液を、又は溶解せずにそのままを、徐々に所定の反応温度に加熱した上記3種(又は2種)の化合物の水溶液又は懸濁液に添加する方法である。高い収率を得る為には、添加終了後、更に適当な時間、攪拌を継続することが好ましい。斯くして主生成物として化合物(1)、及び副生成物として化合物(2)を得ることができる。

【0020】本発明方法においては、化合物(1)又は化合物(2)を単離して用いてもよいが、微生物により上記反応で得られた両者の混合物をそのまま用いることができる場合があるので、その場合混合物を用いることが好ましい。

【0021】化合物(1)及び/又は化合物(2)にアルスロバクター属に属する微生物の菌体又は菌体処理物を作用させることで、容易に光学活性な化合物(3)を得ることができる。具体的には、化合物(1)及び/又は(2)の水溶液、又は化合物(1)及び(2)を得る為に反応を行った反応生成物そのものに微生物の菌体又は菌体処理物を作用させる。微生物の菌体又は菌体処理物を作用させることにより、ヒダントイン化合物は開裂され、N-カルバモイル誘導体(RS-体)が生成され、そして逐次的に目的とする絶対配置を有する光学活性化合物(3)(S-体)が得られる。

【0022】本発明で使用する、化合物(1)及び(2)を光学活性化合物(3)に変換する能力を有するアルスロバクター属に属する微生物としては、例えば特公平5-1716号公報記載のアルスロバクター エスピー(Arthrobacter sp.) DP-B-1001(微工研菌寄第8190号)及びアルスロバクター エスピー(Arthrobacter sp.) DP-B-1002(微工研菌寄第8191号)が挙げられる。また、これら微生物より自然変異、化学変異剤による処理、紫外線や放射線照射等の方法により得られた変異株であっても化合物(1)及び(2)を光学活性化合物(3)に変換する能力を有する限り、本発明に使用することができる。

【0023】本発明で用いる微生物の菌体を製造するには、常法により上記微生物を培地中で培養増殖させればよい。ここで用いる培地は特に制限されず、上記微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含む通常のものでよいが、液体培地が好ましい。

【0024】炭素源としては、例えば、グルコース、フラクトース、シュクロース、マルトース等の糖類、グリセリン、マンニット等の糖アルコール類、フマル酸、クエン酸等の有機酸等が挙げられる。

【0025】窒素源としては、肉エキス、酵母エキス、ポリペプトン、コーンステイプリカー等の天然有機窒素源の他、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機アンモニア源、及びフマル酸アンモニウム、クエン酸アンモニウム等の有機酸のアンモニウム塩が例示される。また、無機塩類としては、リン酸一ナトリウム、リン酸一カリウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン等が挙げられ、これらは必要に応じ適宜使用される。更に酢酸コバルトなどの有機塩類を必要により用いてもよい。

【0026】培地に更に化合物(1)及び(2)を少量添加すれば、変換活性の高い菌体を得られる場合がある。

【0027】培養条件も格別の制限はなく、例えば培地のpHは5~9、好ましくは6~8.5の範囲内に調節し、菌株を接種した後、温度20~35℃、好ましくは26~30℃の範囲内で適当に制御しながら通気攪拌下、16~72時間程度培養を行えばよい。

【0028】斯くして得られる菌体等を適当な水性媒体中において化合物(1)及び/又は(2)に作用せしめる本発明方法により光学活性化合物(3)が効率よく生成される。

【0029】化合物(1)及び/又は(2)に作用せしめる菌体等としては、菌体を含む培養液をそのまま用いてもよい。また、菌体を一旦培養液より分離して洗浄又は洗浄せずに用いてもよい。菌体処理物としては、凍結乾燥菌体、アセトン乾燥菌体、菌体破砕物等が挙げられる。更には、菌体をポリアクリルアミド、アルギン酸カルシウム、カラギーナン、光架橋樹脂などの高分子に包括させて固定化した固定化菌体として使用してもよい。

【0030】本発明の変換反応は、例えば化合物(1)及び/又は(2)と上記培養物とを水溶媒体中に共存せしめることによっても実施することができる。

【0031】本発明方法において、アルスロバクター属に属する微生物として、上述のアルスロバクター エスピー (*Arthrobacter* sp.) DP-B-1001 (微工研菌寄第S190号) 又はアルスロバクター エスピー (*Arthrobacter* sp.) DP-B-1002 (微工研菌寄第S191号) を使用した場合、当該微生物の特異な能力から、化合物(1)及び(2)は、それぞれR-体、S-体、RS-体の何れであっても目的とする光学活性化合物(3) (S-体) に転換することができる。

【0032】すなわち、化合物(1) (RS-体) を原料としても、化合物(2) (RS-体) を原料としても、各々に作用する別種の微生物を使用する必要はなく、化合物(1) (RS-体) を原料とする場合、その製造の際に副生した化合物(2) (RS-体) を除去する必要もなく、更に化合物(2) (RS-体) を原料とする場合、R-体の化合物(2) が反応系に混入するの

を防止する等の措置、又は反応後残存するR-体の化合物(2) を単離回収、ラセミ化するなどの煩雑な工程処理も必要としない。このように、当該菌体又は菌体処理物を用いれば、化合物(1) 又は化合物(2) のR-体、S-体、RS-体或いはそれらの任意の組合わせからなる混合物を原料として、目的とする光学活性化合物(3) (S-体) を得ることができる。

【0033】菌体又は菌体処理物の使用量は所与の反応の場合において目的とする効果を発揮する量(有効量)であればよく、この有効量は当業者であれば簡単な予備実験により容易に求められるが、一般的に洗浄湿润菌体の場合は反応液1dl当たり1~50g程度が好ましい。化合物(1) 及び/又は(2) の濃度は、反応混合物全量(重量)の0.1~30%が好ましく、特に好ましくは0.1~10%である。溶解度以上の化合物(1) 及び/又は(2) を反応系に添加しても、不溶解分は反応進行に伴い溶解し、逐次光学活性化合物(3) (S-体) に転換されて行く為反応に支障はない。更に、固定化菌体をカラムに充填した反応器に原料溶液を流下させる方法により反応を行えば、化合物(1) のみでなく、化合物(2) の高濃度な物を原料として使用できるため、殺菌操作を行う場合も含め操作を容易かつ高濃度で効率良く行うことができ、好ましい。

【0034】本反応は、pH6~11の範囲が好ましく、特に6.5~9.5の範囲で行うのが好適である。pHの範囲は、リン酸緩衝液、アンモニウム緩衝液等の通常使用されている緩衝液で調整すればよい。反応温度は10~50℃が好ましく、特に30~40℃の範囲に調節するのが好適である。更に、反応液に鉄、マンガン、コバルト等の無機イオン又は亜硫酸ナトリウム等の還元性物質を添加、或いは窒素ガスの吹き込みを行うと、反応速度が増大ないし培養物の酵素活性を安定化することができる。また、菌体の反応液からの回収、反応への再使用が可能になるので好ましい。無機イオンは0.1~10mMになる様に添加するのが好ましい。かくして、10~100時間程度反応を行うことにより、化合物(1) 及び/又は(2) より光学活性化合物(3) が容易に且つ効率的に得られる。

【0035】

【実施例】以下、実施例により本発明を更に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0036】参考例1

攪拌装置、温度計、冷却装置を備えた三頸フラスコに、重炭酸アンモニウム50g、苛性ソーダ12g、及び水500mlを加え攪拌溶解し、この溶液に、40℃で1時間をかけてグルタルアルデヒドモノエチレンアセタール35gを滴下し、40℃で5時間攪拌した。反応後、濃縮し析出してきた結晶を濾取し、シリカゲル(2.000g、メルク社製、Art. No. 7734、溶出液：クロロホルム：メタノール=9:1~4:1)を用

いるカラムクロマトにより精製し、化合物(1) 41 g
及び化合物(2) 4 gを得た。

元素分析: $C_9H_{14}N_2O_4$

計算値: C; 50.76, H; 6.72, N; 13.12

実測値: C; 50.66, H; 6.78, N; 13.08

【0038】化合物(2)

【0037】化合物(1)

融点 112°C

融点 177°C

元素分析: $C_9H_{17}N_3O_4$

計算値: C; 46.79, H; 7.62, N; 17.92

実測値: C; 46.58, H; 7.83, N; 17.78

【0039】実施例1

(1) 種菌の培養

グルコース10 g/l、酵母エキス5 g/l、ポリペプトン5 g/l、肉エキス2 g/l、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.4 g/l、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g/l及び $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.01 g/lを含有しpHを7.0に調節した液体培地を、500 ml容三角フラスコに200 ml分注し、滅菌後アルスロバクター エスピー DP-B-1001株を一白金耳接種し、28°C 24時間振とう培養した。

【0040】(2) 本培養、菌体作製

(1)と同じ液体培地に0.15%の化合物(1)を添加した培地を調整し、(1)で得られた培養液を4 ml接種し、28°Cで24時間振とう培養した。培養液から、18,000 G、10分間の遠心により菌体を集め、生

元素分析: $C_8H_{15}NO_4$

計算値: C; 46.79, H; 7.62, N; 17.92

実測値: C; 46.58, H; 7.83, N; 17.78

旋光度 $[\alpha]_D^{20} +4.2$ ($c=5$, H_2O)

【0043】実施例2

(1) 種菌の培養、菌体作製

グルコース10 g/l、酵母エキス5 g/l、ポリペプトン5 g/l、肉エキス2 g/l、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.4 g/l、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g/l及び $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.01 g/lを含有し、pHを7.0に調節した液体培地を、500 ml容三角フラスコに200 ml分注し、滅菌後アルスロバクター エスピー DP-B-1002株を一白金耳接種し、28°C 72時間振とう培養した。培養液から、18,000 G、10分間の遠心により菌体を集め、生理食塩水により1回洗浄し、湿菌体を得、酵素反応に用いる洗浄菌体とした。

元素分析: $C_8H_{15}NO_4$

計算値: C; 46.79, H; 7.62, N; 17.92

実測値: C; 46.63, H; 7.75, N; 17.82

旋光度 $[\alpha]_D^{20} +4.2$ ($c=5$, H_2O)

【0046】

【発明の効果】医薬品及び化粧品品の製造中間体として有

理食塩水により1回洗浄し、湿菌体を得、酵素反応に用いる洗浄菌体とした。

【0041】(3) 酵素反応

(2)で得られた洗浄菌体10 gを精製水50 mlに懸濁したものに、0.8M NH_4OH-Cl (pH8.0)、4mM $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 及び4mM $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ を含有する緩衝液25 mlを加え、参考例1において反応後濃縮し析出してきた結晶を回収した物100 g/lの懸濁液25 mlを加え、窒素気流を吹き込み、37°Cで48時間保温し反応を行った。反応終了後、菌体を遠心分離により除き、遠心上清を濃縮しアルコールを添加して晶析させた。結晶を回収し乾燥してL- α -アミノアジピン酸- γ -セミアルデヒドエチレンアセタール2.0 gを得た。

【0042】融点 269°C (分解)

【0044】(2) 酵素反応

(1)で得られた洗浄菌体10 gを精製水50 mlに懸濁したものに、0.8M NH_4OH-Cl (pH8.0)、4mM $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 及び4mM $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ を含有する組成の緩衝液25 mlを加え、参考例1において反応後濃縮し析出してきた結晶を回収した物100 g/lの懸濁液25 mlを加え、窒素気流を吹き込み、37°Cにて48時間保温し反応を行った。反応終了後、菌体を遠心分離により除き、遠心上清を濃縮しアルコールを添加して晶析させた。結晶を回収し乾燥してL- α -アミノアジピン酸- γ -セミアルデヒドエチレンアセタール2.0 gを得た。

【0045】融点 269°C (分解)

用な光学活性化合物(3)を工業的に有利に製造することができる。

フロントページの続き

(72)発明者 増見 史生

岩手県岩手郡松尾村松尾4-115 第一化
学薬品株式会社岩手工場生産技術センター
内